动 物 学 研 究 1994, 15 (3): 73—80 CN 53-1040／Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

蛇毒丝氨酸蛋白酶多样性
——底物专一性免疫化学及序列比较研究

张 沄 熊郁良 王婉瑜 李文辉 朱绍文
(中国科学院昆明动物研究所 650223)

摘要 本文报道烙铁头(*Trimeresurus mucrosquamatus*)蛇毒纤维蛋白原溶酶(TMVFg)，眼镜王蛇(*Ophiophagus hannah*)蛇毒纤维蛋白原溶酶(OhS1)，竹叶青(*Trimeresurus stejnegeri*)蛇毒专一纤溶酶原激活剂(sv-PA)对5种小分子多肽底物的底物专一性，及这些蛇毒丝氨酸蛋白酶对各种凝血因子(第Ⅹ因子、凝血酶原、纤溶酶原、蛋白C)的作用，并和其它蛇毒丝氨酸蛋白酶如矛头蝮(*Bothrops atrox*)蛇毒凝血酶样酶(Batroxobin)、铜头蝮(*Agkistrodon contortrix contortrix*)蛇毒蛋白C激活剂ACC-C、蝰蛇(*Vipera russelli*)毒第Ⅴ因子激活剂RVV-V进行比较研究。通过酶标偶联免疫反应研究了抗sv-PA抗体与各种丝氨酸蛋白酶的免疫交叉反应，并对蛇毒丝氨酸蛋白酶及相应功能的哺乳动物蛋白酶进行了序列比较分析。从底物专一性多样性及已知序列结构分化上对这一类蛇毒丝氨酸蛋白酶的结构与功能进行了探讨和研究。

关键词 蛇毒，蛋白酶，序列 烙铁头蛇，免疫化学

在长期的进化过程中，蛇毒演化生成了很多能作用于哺乳动物凝血及纤溶系统各因子的蛋白酶。通过专一性的激活或灭活作用，这些蛋白酶几乎作用于血凝纤溶系统的每一步骤，产生促凝或抗凝效应。其中一类在生化性质上属丝氨酸蛋白酶类，如第Ⅴ因子激活剂(Kisiel，1979)、凝血酶样酶(Ioth等，1987；Shieh等，1988)，纤维蛋白原溶酶(Zhang等，1991)、蛋白C激活剂(McMullen等，1989)及新近发现的专一性纤溶酶原激活剂(Zhang，1992，1993)。对这一类蛋白酶的结构与功能研究无疑会对我们搞清蛋白质多样性，结构与功能关系具有重大意义。我们已纯化了烙铁头蛇毒纤维蛋白原溶酶TMVFg(Zhang等，1991)，眼镜王蛇蛇毒纤维蛋白原溶酶OhS1(Zhang等，1994)和竹叶青蛇毒专一性纤溶酶原激活剂sv-PA(Zhang，1992，1993)，并生产了兔抗sv-PA多克隆抗体，对它们及其它蛇毒丝氨酸蛋白酶进行结构与功能的比较研究是很有意义的。

1 材料和方法

1.1 材料

多肽发色底物 H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238)，H-D-Val-Leu-Lys-pNA (S-2251)，H-D-Pro-Phe-Arg-pNA (S-2302)，H-D-Val-Leu-Arg-pNA (S-2266)和Bz-Ile-Glu -Gly-Arg-pNA (S-2222)，人纤维蛋白原为瑞典Kabi公司产品。烙铁头

本文1993年9月8日收到，1994年1月5日修回

(*Trimeresurus mucrosquamatus*) 蛇毒、竹叶青(*Trimeresurus stejnegeri*) 蛇毒、眼镜王蛇(*Ophiophagus hannah*) 蛇毒由本实验室提供。牛血第Ⅹ因子、人凝血酶原、人尿激酶、人Glu-纤溶酶原、牛凝血酶及胰蛋白酶、矛头蝮 (*Bothrops atrox*) 蛇毒凝血酶样酶Batroxobin 由美国 Sigma 公司购买；人纤溶系统蛋白 C 和人组织纤溶酶原激活剂 t-PA为法国 Diagno Stago 公司产品．其它试剂均为分析纯以上符合实验要求。

1.2 方法

1.2.1 蛇毒丝氨酸蛋白酶纯化　烙铁头蛇毒纤维蛋白原溶酶 TMVFg 根据 Zhang 等(1991)方法纯化，竹叶青蛇毒专一性纤溶酶原激活剂 sv-PA 按前文所述方法纯化(Zhang，1992)。眼镜王蛇毒纤维蛋白原溶酶 OhSI 按 Zhang 等(1994)方法纯化。

1.2.2 对小肽底物的水解　蛋白酶对小肽底物的水解用分光光度计进行。反应缓冲液为 50 mM Tris-HCl，pH7.8，0.01% Tween-80，反应总体积 500 μl，底物浓度 0.2—0.3 mM，待测酶(TMVFg、OhS1，sv-PA)浓度 0.6—2 μg／ml。产物生成在 405 nm 处连续扫描，所用的 p-nitroanilide 克分子消光系数为 $10000M^{-1}\cdot cm^{-1}$。

1.2.3 第Ⅹ因子激活活性测定　第Ⅹ因子激活是测定活化的第Ⅹ因子对小肽底物 S-2222的水解活力。纯化的第Ⅹ因子 25 μg／ml 于 50 mM Tris-HCl，pH7.6，5 mM $CaCl_2$ 缓冲液中和待测酶(2 μg／ml 终浓度)在 37℃ 保温，不同时间间隔下取 25 μl 激活液测定其对小肽底物水解活力，检测液中含 0.2 mM S-2222，方法如上进行。

1.2.4 凝血酶原激活活性测定　主要根据 Hofmann 等(1987)方法进行。纯化的人凝血酶原(50 μg／ml)于 50 mM Tris-HCl，pH7.8，0.1 M NaCl 中和待测酶(5 μg／ml)于 37℃ 下保温，不同时间间隔下，取 50 μl 激活液测定其对小肽底物 S-2238 的水解活力。

1.2.5 纤溶酶原激活活性测定　根据 Zhang(1992)方法进行。纯化的人 Glu-纤溶酶原(100 μg／ml)于 50 mM Tris-HCl，pH7.8，0.01% Tween-80 缓冲液中和待测酶(10 μg／ml)在 37℃ 下保温，不同时间间隔下，取 50 μl 激活液测定其对小肽底物 S-2251的水解活力，检测缓冲液为 20 mM Tris-HCl，pH7.8，0.01% Tween-80，S-2251 底物浓度 0.3 mM。

1.2.6 蛋白 C 激活活性测定　根据 Kisiel 等(1987)方法进行一定改进。人蛋白C(5 μg／ml)于 50 mM Tris-HCl，pH7.8，1 mg／ml PEG，5 mM EDTA 中和待测酶(1 μg／ml)在 37℃ 下保温，不同时间间隔下取 50 μl 激活液测定其对小肽底物 S-2302 的水解活力。

1.2.7 酶标偶联免疫反应　免抗 sv-PA 多克隆抗体按前文方法而得(Zhang，1992)。酶标偶联免疫反应(ELISA)测定免疫交叉反应按 Valerie 等(1989)方法进行，ELISA 滴度是以达到最大反应值一半时的血清稀释倍数或抗体浓度表示，结果中所列数值为 3 次独立实验平均值。

1.2.8 序列比较　本文中所用的蛋白质序列比较方法主要根据 Wilbur 等(1983)，Higgins等(1989)方法进行。插入间隔(---)为取得最大相似度、使用蝰蛇毒第Ⅴ因子激活剂RVV-Ⅴ编号系统。系列信息来源于：蝰蛇毒第Ⅴ因子激活剂 RVV-Ⅴr(Tokunaga 等，1988)，铜头蝮蛇毒蛋白 C 激活剂 ACC-C(McMullen 等，1989)，黄绿竹叶青(*T. flavoviridius*)蛇毒凝血酶样酶 flavoxobin (Shieh 等，1988)，矛头蝮蛇毒凝血酶样酶Batroxobin (Ioth 等，1987)，胰蛋白酶(Titani 等，1975)，大鼠激肽释放酶(Swift 等

1982)，人组织纤溶酶激活剂 t-PA 轻链(Pennica 等，1983)、人尿激酶 b-链(Steffens 等，1982)、牛凝血酶 B-链(Magnusson 等、1975)和人第Ⅸ因子重链(Kurachi 等、1982)。

2 结果

2.1 对小分子多肽底物的水解

我们首先对烙铁头蛇毒中得到的纤维蛋白原溶酶 TMVFg，分子量 26 kDa、丝氨酸蛋白酶(Zhang 等，1991)、竹叶青蛇毒专一纤溶酶原激活剂 sv-PA、分子量 31 kDa，丝氨酸蛋白酶(Zhang，1992，1993)，并和别的蛇毒丝氨酸蛋白酶进行了比较。从表 1 的结果可看出这些蛇毒丝氨酸蛋白酶都对各种小分子多肽底物有不同程度的水解活力。但同一

表 1　丝氨酸蛋白酶对小分子多肽底物的作用

Tab. 1　Activities of serine proteases on several chromogenic substrates

	Activity [μmol/(min·mg)]				
	S-2238 (0.2 mM)	S-2251 (0.3 mM)	S-2266 (0.2 mM)	S-2302 (0.4 mM)	S-2222 (0.3 mM)
sv-PA	25	5.2	8.0	3.3	0.1
OhS1	1.2	0.2	9.6	12	0.3
TMVFg	13.6	0.2	11.3	3.2	0
ACC-C①	0.4	0	0.6	0.3	0.9
RVV-V②	0.01	ND	ND	ND	ND
Trypsin	46	8.6	20	14.5	110
Urokinase	1.0	0	0.3	0.2	0.8
Thrombin	68	0.3	1.3	4.1	1.5

①：Kisiel，*et al*，1987；②：Kisiel，1979

表 2　蛇毒丝氨酸蛋白酶对血浆因子的作用

Tab. 2　Effects of venom serine proteases on blood coagulation factors

	Factor Ⅹ	Prothrombin	Protein C	Plasminogen	Fibrinogen
TMVFg	---	---	---	---	+++a
OhS1	---	---	---	---	+++a
sv-PA	---	---	---	+++	---
Batroxobin	---	---	---	---	+++b
ACC-C①	---	---	+++	---	+++a

① Kisiel,*et al.*，1987

注：(---)表示不能激活该血浆因子，(+++)能激活该血浆因子，

(a) 裂解纤维蛋白原，(b) 凝固纤维蛋白原

表 3　抗 sv-PA 抗体和丝氨酸蛋白酶免疫交叉反应

Tab. 3　ELISA titers of anti-sv-PA sera and antibodies

Antigen	Serum	Immunoglubins
sv-PA	10^6	0.2 μg/ml
OhS1	10^3	100 μg/ml
TMVFg	10^5	2 μg/ml
Batroxobin	10^4	2 μg/ml
Tryspin	640	310 μg/ml
Thrombin	<10	>20 mg/ml
Urokinase	<10	>20 mg/ml
t-PA	<10	>20 mg/ml

种蛋白酶对不同底物，不同蛋白酶对同一种底物又存在很大的底物专一性差异。

2.2 对大分子底物的作用

TMVFg 和 OhS1 直接水解纤维蛋白原，但它们都不能激活第Ⅹ因子，凝血酶原、蛋白 C 和纤溶酶原也不能凝固纤维蛋白原(即不具有凝血酶样酶活性)；而另一方面，sv-PA 专一性激活纤溶酶原，但却不能直接水解纤维蛋白原，它也不能激活第Ⅹ因子、凝血酶原、蛋白 C，结果(表 2)显示了这一类蛇毒丝氨酸蛋白酶的大分子底物多样性分化及高度专一性.

2.3 免疫交叉反应

从表 3 的结果可看出，抗 sv-PA 抗血清和抗体 TMVFg，OhS1 及 Batroxobin 都有很强的免疫交叉反应，显示了这一类蛋白酶在序列结构及空间结构上的同源性和相似性。而相反与别的丝氨酸蛋白酶比较，抗 sv-PA 抗体仅能和胰蛋白酶有一定的免疫交叉反应，却不能和别的哺乳动物丝氨酸蛋白酶进行免疫交叉反应，尽管它们具有相同的大分子底物专一性，如纤溶酶原激活，凝固纤维蛋白原等。

2.4 序列比较分析

根据已测定的结果，sv-PA 在测定的 N-末端 40 个氨基酸及内肽序列上与蛇毒凝血酶样酶存在极大的同源性(Zhang，1992，1993)。图 1 将已测定全序列的这一类蛇毒丝氨酸蛋白酶：蛋白 C 激活剂、第Ⅴ因子激活剂及两个凝血酶样酶进行序列比较分析，并和它们的哺乳动物来源的具有相同大分子底物专一性的丝氨酸蛋白酶进行了比较。结果表明：1)所有的这些丝氨酸蛋白酶都含有高度的活性中心保守区域，其中含有 His，Asp 和 Ser 残基组成的酶催化活性中心。2)这一类蛇毒丝氨酸蛋白酶是胰蛋白酶类似的。而且它们的特点是 N-末端总是 V-X-G-G-D-E-C-N-I-N-。与部分测定序列的激肽释放酶有同样情况(Zhang，1992；Komori 等，1988)。3)这些蛇毒丝氨酸蛋白酶的 6 对二硫键可以从和胰蛋白酶比较的结构中推导出(Shieh 等，1988；Tokunaga 等，1988)，即 Cys7-Cys141，Cys28-Cys44，Cys76-Cys234，Cys120-Cys188，Cys152-Cys167，Cys178-Cys203。在这 6 对二硫键中，Cys76-Cys234 是蛇毒丝氨酸蛋白酶特有的。显而易见，Cys76-Cys234 二硫键的形成使蛇毒丝氨酸蛋白酶的构像更紧密，酶的动态结构可塑性更小。4)序列逐段分析结果表明 Asp45-Leu84 这一段是这一类蛇毒丝氨酸蛋白酶的高度可变区域，序列差异在 53%—63%之间，因而这一段序列突变在造成蛇毒丝氨酸蛋白酶底物专一性分化(特别是对大分子底物)中所起的重要作用是非常明显的。5)蛋白 C 激活剂和矛头蝮凝血酶样酶是高度同源的(70%相似度)，但它们的底物专一性却不一样。

图 2 表明了这些丝氨酸蛋白酶的序列相似度。蛇毒丝氨酸蛋白酶之间的序列相似度为 60%—70%，和别的丝氨酸蛋白酶比较，序列相似度在 25%—40%之间，虽然凝血酶样酶也能凝固纤维蛋白原，但它们和凝血酶 B 链的序列相似度仅为 25%。

3 讨论

sv-PA 是新近从蛇毒中发现并纯化的专一性纤溶酶原激活剂，它专一性切断人 Glu-

```
                  10        20        30        40        50          60        70        80
RVV-Vr      VVGGDECNINEHPFLVALYTSAS-S---TIHCAGALINREWVLTAAHCDRRNIRIKLGM----HSKNIRNEDEQIRVPRGKYFCLNTKFPNGLD------
ACC-C       VIGGDECNINEHRFLALVYANGS-------LCGGTLINQEWVLTARHCDRGNMRIYLGM----HNLKVLNKDALRRFPKEKYFCLNTRNDTIWD------
Flavoxobin  VVGGDECNINEHPFLVALYDAWS-G---RFLCGGTLINPEWVLTAAHCDSKNFKMKLGA----HSQKVLNEDEQIRNPKEKFICPNKKNTEVLD------
Batroxobin  VIGGDECDINEHPFLAFMYY--S-P---RYFCGMTLINQEWVLTAAHCNRRFMRIHLGK----HAGSVANYDEVVRYPKEKFICPNKKKNVITD------
Trypsin     IVGGYTCGANTVPYQVSLNSGYHF-------CGGSLINSQWVVSAAHCYKSGIQVRLGQ----DNINVVEGNQQFISASKSIVHPSYN----------S
Kallikrein  VVGGYNCEMNSQPWQVAV---YYFG---EYLCGGVLIDPSWVITAAHCATDNYQVWLGR----NNLYEDEPFAQHRLVSQSFPHPGFNQDLIWNHTRQPG
t-PA        IKGGLFADIASHPWQAAIFAKHRRSPGERFLCGGILISSCWILSAAHCFQERFPP-H------HLTVILGRTYRVVPGEEEQKFEV-EKYIVHKEFDDDT
Urokinase   IIGGEFTTIENQPWFAAIYRRHR-GGSVTYVCGGSLISPCWVISATHCFID-YPKKE------DYIVYLGRSRLNSNTQGEMKFEV-ENLILHKDYSADT
Thromobin   IVEGQDAEVGLSPWQVMLF----RKSPQELLCGASLISDRWVLTAAHCLL--YPPWXKNFTVDDLLVRIGKHSRTRYERKVEKISMLDKIYIHPRYNWK-
Factor IX   VVGGEDAKPGQFPWQVVL------NGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCV-------ETGVKIT---VVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRAIIPHHNYNAAI
               *                         *         *    * Δ*

                 90        100       110            120           130        140         150        160
RVV-Vr      ----KDIMLIRLR----RPVTYSTHIAPVSLPSRSRGV-----GSRCRIMGWGKI-----STTEDTYPDVPHCTNIFIVKHKWCEPLYP-WVPADSRTLC
ACC-C       ----KDIMLIRLN----RPVRNSAHIAPLSLPSNPPSV-----GSVCRIMGWGTI-----TSPNATLPDVPHCANINILDYAVCQAAYK-GLAA--TTLC
Flavoxobin  ----KDIMLIKLD----SPVSYSEHIAPLSLPSSPPSV-----GSVCRIMGWGSI-----TPVEETFPDVPHCANINLLDDVECKPGYP-ELLPEYRTLC
Batroxobin  ----KDIMLIRLD----RPVKNSEHIAPLSLPSNPPSV-----GSVCRIMGWGAI-----TTSEDTYPDVPHCANINLFNNTVCREAYN-GLPA--KTLC
Trypsin     NTLNNDIMLIKLK----SAASLNSRVASISLPTSCASA-----GTQCLISGWGNT-----KSSGTSYPDVLKCLKAPILSNSSCKSAYP-GQITS-NMFC
Kallikrein  DDYSNDLMLLHLS----QPADITDGVKVIDLPIEEPKV-----GSTCLASGWGSI-----TPDGLELSDDLQCVNIDLLSNEKCVEAHK-EEVTD-LMLC
t-PA        --YDNDIALLQLKSDSSRCAQESSVVRTVCLPPADLQLP--DW-TECELSGYGK-----HEALSPFYSERLKEAHVRLYPSSRCTSQHLLNRTVTDNMLC
Urokinase   LAHHNDIALLKIRSKEGRCAQPSRTIQTICLPSM-YNDP--QFGTSCEITGFGK-----ENSTDYLYPEQLKMTVVKLISHRECQQPHYYGSEVTTKMLC
Thromobin   ENLDRDIALLKLK----RPIELSDYIHPVCLPDKQTAAKLLHAGFKGRVTGWGNRRETWTTSVAEVQPSVLQVVNLPLVERPVCKASTRI--RITNDMFC
Factor IX   NKYNHDIALLELD----EPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFG-SGYVSGWGRVFHKGRSAL------VLQYLRVPLVDRATCLRSTKF--TIYNNMFC
                Δ  *                                           * *                              *          *

            170          180        190             200        210        220        230
RVV-Vr      AGIL-----KGGR-DTCHGDSGGPLICNGEMH------GIVAGGSEPCGQHLKPAVYTKVFDYNNWIQSIIAGNRTVTCPP
ACC-C       AGIL-----EGGK-DTCKGDSGGPLICNGQFQ------GILSVGGNPCAQPRKPGIYTKVFDYTDWIQSIISGNTDATCPP
Flavoxobin  AGVL-----QGGI-DTCGFDSGTPLICNGQFQ------GIVYIGSHPCGQSRKPGIYTKVFDYNAWIQSIIAGNTAATCLP
Batroxobin  AGVL-----QGGI-DTCGGDSGGPLICNGQFQ------GILSWGSDPCAEPRKPAFYTKVFDYLPWIQSIIAGNKTATC-P
Trypsin     AGYL-----EGGK-DSCQGDSGGPVVCSGKLQ------GIVSWG-SGCAQKNKPGVYTKVCNYVSWIKQTIASN-------
Kallikrein  AGEM-----DGGK-DTCKGDSGGPLICNGVLQ------GITSWGFNPCGEPKKPGIYTKLIKFTPWIKEVMKEN------P
t-PA        AGDTRSGGPQANLHDACQGDSGGPLVCL--NDGRMTLVGIISWG-LGCGQKDVPGVYTKVTNYLDWIRDNMRP--------
Urokinase   AADPQWKT------DSCQGDSGGPLVCS--LQGRMTLTGIVGWG-RGCALKDKPGVYTRVSHFLPWIRSHTKEENGLA--L
Thromobin   AG---YKPGEGKRGDACEGDSGGPFVMKSPYNNRWYQMGIVSWG-EGCDRNGKYGFYTHVFRLKKWIQ---KVIDRLG--S
Factor IX   AG---FH--EGGR-DSCQGDSGGPHV--TEVEGTSFLTGIISWG-EECAMKGKYGIYTKVSRYVNWI----KEKTKL---T
            *                 * *  *Δ* *               **   *   *          **        **
```

图 1　丝氨酸蛋白酶序列比较

Fig. 1　The alignment of serine protease sequences

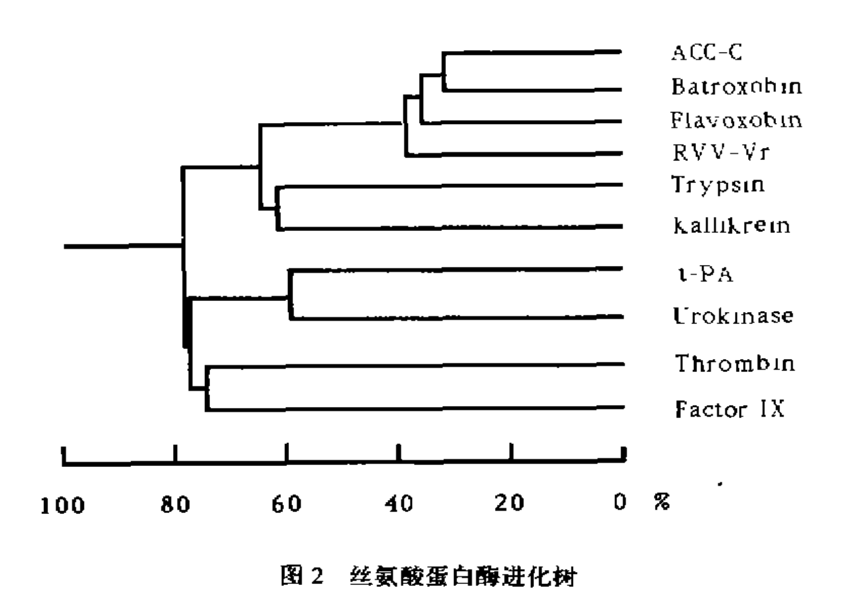


图2 丝氨酸蛋白酶进化树

Fig. 2 Evolutionary trees of the serine proteases. The probable evolutionary relationship of the sequences aligned in figure 1 was shown here. The horizontal axis indicated the percent difference between sequences

(图1所列序列的丝氨酸蛋白酶可能的进化关系显示在此，平行轴表明了序列的差异百分数)

纤溶酶原 Arg560-Val561 肽键形成双链纤溶酶，它不能直接水解人纤维蛋白原(Zhang, 1992, 1993)。OhS1 和 TMVFg 是分别从眼镜王蛇蛇毒和烙铁头蛇毒中纯化的两个丝氨酸蛋白酶，直接水解人纤维蛋白原(Zhang 等，1991，1994)。本文的研究结果表明抗 sv-PA 抗血清能和 OhS1、TMVFg 及美洲矛头蝮凝血酶样酶 Batroxobin 产生强的免疫交叉反应，证明了这些蛇毒丝氨酸蛋白酶在结构上的相关性。这一结果与 sv-PA 的序列测定结果一致，在已测定的 sv-PA N-末端 40 个氨基酸及胰蛋白酶水解内肽片段序列中，显示了和蛇毒凝血酶样酶极大的同源性(Zhang, 1992, 1993)。

表1的结果表明这些蛇毒蛋白酶都对小分子多肽底物有不同程度的水解，但底物专一性差别也大。与胰蛋白酶不同，蛇毒丝氨酸蛋白酶对第X因子的良好底物 S-2222 活力很低。

这些蛇毒丝氨酸蛋白酶的底物专一性多样性分化集中表现在对大分子蛋白底物上，也就是在其生物功能多样性上。凝血酶在生理上能凝固纤维蛋白原，激活V因子，蛋白C等，蛇毒凝血酶样酶只具备它的一部分功能，即从纤维蛋白原上释放A肽、B肽而凝固纤维蛋白原。从序列比较中可看出，凝血酶分子的动态结构可塑性远大于蛇毒丝氨酸蛋白酶。

从免疫化学的证据和目前所获得的一级结构信息可发现这一类底物专一性分化很大的蛇毒丝氨酸蛋白酶存在结构上的同源性及相似性。Asp45-Leu84(RVV-V 编号系统)是这

类蛋白酶的高度可变区；可以推论、这一段肽段在形成底物专一性分化上起着关键作用，它们可能是形成大分子底物结合部位的关键肽段。序列结构的多样性造成了底物专一性多样性，从而进一步显示生物功能多样性。从序列比较中还可以推导，由于二硫键形成的关系，这类蛇毒丝氨酸蛋白酶在空间构像上及酶分子本身的动态可塑性上要比胰蛋白酶紧密，这可以作为解释不同于胰蛋白酶，它们一般都有较强的底物专一性的原因之一。

参 考 文 献

Higgins D G, Sharp P M, 1989. Fast and sentitive multiple sequence alignments on a microcomputer. CABIOS, **5**: 151-153

Hofmann H, Bon C, 1987 Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator *Biochemistry*, **26**: 772-780.

Itoh N *et al*, 1987. Molecular clonging and sequence analysis of cDNA for Batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme *J Biol Chem*, **262**: 3132-3135.

Kisiel W, 1979. Molecular properties of the factor V-activating Enzyme from Russell's viper venom. *J Biol Chem.*, **254**: 12230-12234.

Kisiel W *et al*, 1987. Characterization of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *J. Biol. Chem.*, **262**: 12607-12613.

Komori Y *et al*, 1988. Biochemical and physiological studies on a kallikrein-like enzyme from the venom of *Crotalus viridis viridis* (Prairie rattlesnake). *Biochimi. Biophysi. Acta*, **967**: 92-102.

Kuraachi K, Davie E W, 1982 Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor Ⅸ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**: 6461-6464.

Magnusson S *et al*, 1975. Complete primary structure of prothrombin: Isolation, structure and reactivity of ten carboxylated glutamic acid residues and regulation of prothrombin activation by thrombin. In: Reich E, Rifkin D B, Shaw E Eds. Proteases and Biological Control. N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 123-149.

McMullen B A *et al*, 1989. Primary structure of a protein C activator from *Agkistrodon contortrix contortrix* venom. *Biochemistry*, **28**: 674-679.

Pennica D *et al*, 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli* *Nature*, **301**: 214-221.

Shieh T G *et al*, 1988. Amino acid sequence of a coagulant enzyme, flavoxobin, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *J. Biochem*, **103**: 596-605.

Steffens G J *et al*, 1982. The complete amino acid sequence of low molecular mass urokinase from human urine *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **363**: 1043-1058.

Swift G H *et al*, 1982. Rat pancreatic kallikrein mRNA: Nucleotide sequence of the encoded preproenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**: 7263-7267.

Titani K *et al*, 1975. Amino acid sequence of dogfish trypsin. *Biochemistry*, **14**: 1358-1366.

Tokunaga F *et al*, 1988. The factor V-activating enzyme (RVV-V) from Russell's viper venom. Identification of isoproteins RVV-Va, -Vb and Vr and their complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, **263**: 17471-17481.

Valerie C *et al*, 1989. Neutralization of lethal potency and inhibition of enzymatic activity of a phospholipase A_2 neurotoxin, crotoxin, by non-precipitating antibodies (Fab) FEBS letter, **244**: 167-173

Wilbur W J, Lipman D J, 1983. Rapid similarity searches of nucleic acid and protein date banks. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **80**: 726-730.

Zhang Y, Xiong Y L, 1991. Purification and characterizationn of a new fibrinogenase from the venom of the Chinese habu snake(*Trimereusurs musrosquamatus*) *Zoological Research*, **12**: 199-207.

Zhang Y, 1992. Plasminogen activator (sv-PA) from the snake venom of *Trimeresurus stejnegeri*, **1**, purification and characterization. In: Ph. D. thesis (in Eng.), Chinese Academy of Sciences, 47-289.

Zhang Y *et al*. 1993 sv-PA, a specific plasminogen activator from the venom of *Trimeresurus stejnegeri* *Toxicon*, **31**: 539

Zhang Yun, Li Wenhui, Xiong Yuliang *et al*, 1994. Characterization of OhS1, an arginine/lysine amidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Toxicon*, **32**(5): 615-623.

SNAKE VENOM SERINE PROTEASE DIVERSITY
——SUBSTRATE SPECTIFICITY IMMUNO-CHEMISTRY AND SEQUENCE COMPARISON STUDIES

Zhang Yun Xiong Yuliang Wang Wanyu Li Wenhui Zhu Shaowen

(*Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223 *China*)

Abstract

The substrate specificities of TMVFg (a fibrinogenase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom), OhS1 (a fibrinogenase from *Ophiophagus hannah* venom) and sv-PA (a specific plasminogen activator from *Trimeresurus stefnegeri* venom) on five chromogenic substrates were studied. Further, We studied the effects of these venom serine proteases on purified blood coagulation factors, like factor X, prothrombin, plasminogen and protein C. The comparison studies were dealed with other venom serine proteases, like *Bothrops atrox* venom thrombin-like enzyme (Batroxobin), *Agkistrodon contortrix contortrix* venom protein C activator (ACC-C) and *Vipera russelli* venom factor V activator (RVV-V), and also with trypsin, thrombin, urokinase. Immunochemical study by ELISA proved that anti-sv-PA antibodies cross-reacted with other venom serine proteases but did not cross react with thrombin, urokinase and t-PA. We also compared the sequences of these serine proteases. Based on the results of substrate specificity, immuno-chemistry and sequence comparasion, the paper give the discussion on the structure function relationship of these serine proteases.

Key words Snake venom, Protease, Sequence